

Otimização Dinâmica da Produção de Anticorpos Monoclonais em Células Animais

Jasper Hendrik Moltrecht

Resumo

A indústria biofarmacêutica fornece produtos farmacêuticos baseados em proteínas com valor elevado, produzidos por células microbianas e animais. A cultura de células animais é o único método para produzir proteínas com modificações pós-translacionais idênticos com os do humano, que são aplicados a um amplo conjunto de doenças. Porém, pela complexidade do metabolismo das células e restrições das agências reguladoras, o processo de cultivo indica investimentos elevados, ambos no financiamento e na mão de obra. A otimização dos processos é tradicionalmente feita apenas por estudos experimentais, no entanto há maior interesse em métodos que envolvem abordagens computacionais. Modelos adequados e validados proporcionam valioso conhecimento sobre o processo, e em cima disso permitem estudos de otimização ou controle ótimo. Nesse estudo, a modelagem de distintos modos de operação de biorreatores em taque agitado foi realizada. Em cima disso, diferentes aplicações da otimização dinâmica foram esboçados, começando com determinação da melhor estratégia de alimentação na batelada alimentada, da melhor taxa de diluição na operação contínua e controle ótimo na perfusão.

Palavras-Chave

Otimização Dinâmica — Cultura de Células Animais — Anticorpos Monoclonais

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Chemical Engineering Program/COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author: jasper@peq.coppe.ufrj.br

Sumário

Introdução	1
1 Modelagem	2
1.1 Batelada Simples	2
1.2 Batelada Alimentada	2
1.3 Biorreator Contínuo	4
1.4 Perfusão	5
2 Otimização	6
2.1 Batelada simples	6
2.2 Batelada alimentada	6
2.3 Biorreator Continuo	6
2.4 Perfusão	6
3 Resultados e Discussão	7
Agradecimentos	7

Introdução

A indústria de bioprocessos é responsável pela produção de uma grande quantidade de agentes terapêuticos e diagnósticos de origem biológica. A maioridade desses produtos são drogas baseadas em proteínas (como anticorpos, hormônios e fatores de crescimento) e são destinados a aplicações terapêuticas ou

para uso como ferramentas de diagnóstico *in vivo*. Os anticorpos monoclonais (mAbs) constituem a classe de proteínas terapêuticas mais estudada e utilizada atualmente, aprovados para o tratamento de uma variedade de doenças como câncer, esclerose múltipla ou desordens autoimunes, que afeitam a qualidade de vida de milhões de pessoas [? ?].

Em 2013, biofármacos geraram receitas globais de US\$ 163 bilhões, que é por volta de 20 % do mercado farmacêutico. O setor das biofármacos está crescendo a taxas anuais maior que 8 %, o dobro do setor de fármacos em geral. Entre os 10 biofármacos mais vendidos no mundo, sete são mAbs e derivados, os quais corresponderam a US\$ 54.2 bilhões em 2013 [? ?].

No Brasil, a maioria das biofármacos tem que ser importados, e geram uma economia de R\$ 4.1 bilhões por ano nas compras públicas, que é mais que a metade (51 %) dos gastos do Ministério da Saúde. No entanto, o estabelecimento de uma produção própria de biosimilares¹ no país é de grande interesse público e econômico [? ?].

Na indústria de bioprocessos, diferente da indústria química ou petroquímica, a otimização de processos permanece principalmente empírico. Isto tem duas desvantagens principais: em primeiro lugar, baseia-se fortemente em experimentos e análises de amostras de custo elevado e demorado. Em se-

¹ Medicamento biofarmacêutico com atividade similar ao um medicamento que já foi licenciado e cuja patente venceu

gundo lugar, não é possível considerar interações entre os parâmetros operacionais. Modelos expressos em termos matemáticos, baseados na integração de dados experimentais e conhecimento biológico, podem fornecer uma plataforma para análise de sistemas e otimização de processos [?].

Nesse trabalho, os modos de operação de biorreatores em tanque agitado batelada simples, batelada alimentada, contínuo simples, e perfusão foram modeladas e comparadas. A modelagem foi realizada a partir de um modelo da produção de anticorpos monoclonais (anti-TNP) com células híbridomas em modo de operação batelada simples, que foi validado com dados experimentais pelos autores [?].

Baseados nesses modelos, estudos de otimização dinâmica e controle preditivo foram realizados. Afinal, a possibilidade da integração da otimização dinâmica em tempo real (D-RTO) e do controle preditivo (MPC) foi discutido.

1. Modelagem

A partir de um modelo da produção de anticorpos monoclonais (anti-TNP) com células híbridomas em modo de operação batelada simples [?], que foi validado com dados experimentais pelos autores, a modelagem dos modos de operação batelada alimentada, contínuo e perfusão foi realizada. A figura 1 destaca as principais diferenças entre os diferentes modos de operação.

1.1 Batelada Simples

O modelo do biorreator em modo de operação batelada simples foi adaptado de [?]. Ele é constituído de duas equações algébricas (1), que descrevem a taxa de crescimento e morte das células, sete equações diferenciais (2), que descrevem o balanço de massa de células, substratos e produtos no tempo, e 20 parâmetros (Tabela 3). As taxas de crescimento μ e de morte k_d específicas são baseados no modelo de Monod estendido, μ é limitado por glutamina (GLN) e inibido por amônio (AMM) e Lactato (LAC), e k_d é inibido por GLN e limitado por AMM e LAC (Equações 1a e 1b). A taxa de produção de células viáveis $\frac{dX_v}{dt}$ é expressa como diferença entre taxa de crescimento e taxa de morte das células (Equação 2a). A taxa de consumo de glicose $\frac{dGLC}{dt}$ é dividido em crescimento celular e formação de LAC (Equação 2c). A taxa de consumo de glutamina $\frac{dGLN}{dt}$ consista da decomposição química de primeira ordem, da formação de células viáveis e da formação de AMM (Equação 2d). As taxas $\frac{dLAC}{dt}$ e $\frac{dAMM}{dt}$ são associadas com o crescimento celular, e no caso do LAC também com a manutenção das células (Equações 2e e 2f). A taxa de produção do anticorpo monoclonal $\frac{dMAB}{dt}$ é parcialmente associado ao crescimento celular (Equação 2g). As condições iniciais encontram-se na tabela 1.

$$\mu_X = \mu_{X,max} \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \left[\frac{k_{i,AMM}}{k_{i,AMM} + AMM} \right] \left[\frac{k_{i,LAC}}{k_{i,LAC} + LAC} \right] \quad (1a)$$

Tabela 1. Condições Iniciais

Variável	Unidade	Valor
X_V	cells/L	0.2×10^9
X_d	cells/L	0
GLC	g/L	5
GLN	g/L	1.2
LAC	g/L	0.2
AMM	g/L	0
MAB	g/L	0
V	L	400

$$k_d = k_{d,max} \left[\frac{AMM}{k_{i,AMM}^d + AMM} \right] \left[\frac{LAC}{k_{i,LAC}^d + LAC} \right] \left[\frac{k_{i,GLN}^d}{k_{i,GLN}^d + GLN} \right] \quad (1b)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu_X X_v - k_d X_v \quad (2a)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_v \quad (2b)$$

$$\frac{dGLC}{dt} = -\frac{\mu_X X_v}{Y_{X_v/GLC}} - \frac{a_1 \mu_X X_v}{Y_{LAC/GLC}} \quad (2c)$$

$$\frac{dGLN}{dt} = -K \cdot GLN - \frac{\mu_X X_v}{Y_{X_v/GLN}} - \frac{a_2 \mu_X X_v}{Y_{AMM/GLN}} \quad (2d)$$

$$\frac{dLAC}{dt} = a_3 \mu_X X_v + b_1 X_v \quad (2e)$$

$$\frac{dAMM}{dt} = a_4 \mu_X X_v \quad (2f)$$

$$\frac{dMAB}{dt} = a_5 \mu_X X_v + b_2 X_v \quad (2g)$$

Para validação, o modelo foi implementado em MATLAB R2015a e resolvido com o solver ode45. Os resultados são mostrados em Figura 2 e pode se observar a cinética comum de um bioprocessamento em batelada simples, as células se duplicam exponencialmente até a depleção dos nutrientes (GLC e GLN). Durante da fase de crescimento acumulam-se os co-produtos LAC e AMM, que são inibidores do crescimento e promovem o morte das células. Porém, sem nutrientes e na presença de AMM e LAC em concentrações elevadas, começa a fase de morte das células. Com o morte das células a formação do produto MAB é limitado, e a batelada chega ao fim. Os gráficos obtidos são similares com os mostrados por [?], então o modelo pode ser considerado como válido.

1.2 Batelada Alimentada

Para evitar o problema da depleção de nutrientes, é comum operar o biorreator em batelada alimentada, em que uma vazão de entrada Q_{in} suplementa o reator com meio novo. As equações 3 mostram o modelo reformulado para a operação batelada alimentada. Como o volume não é mais constante mas suspeito à mudança pela vazão de entrada, foi adicionada

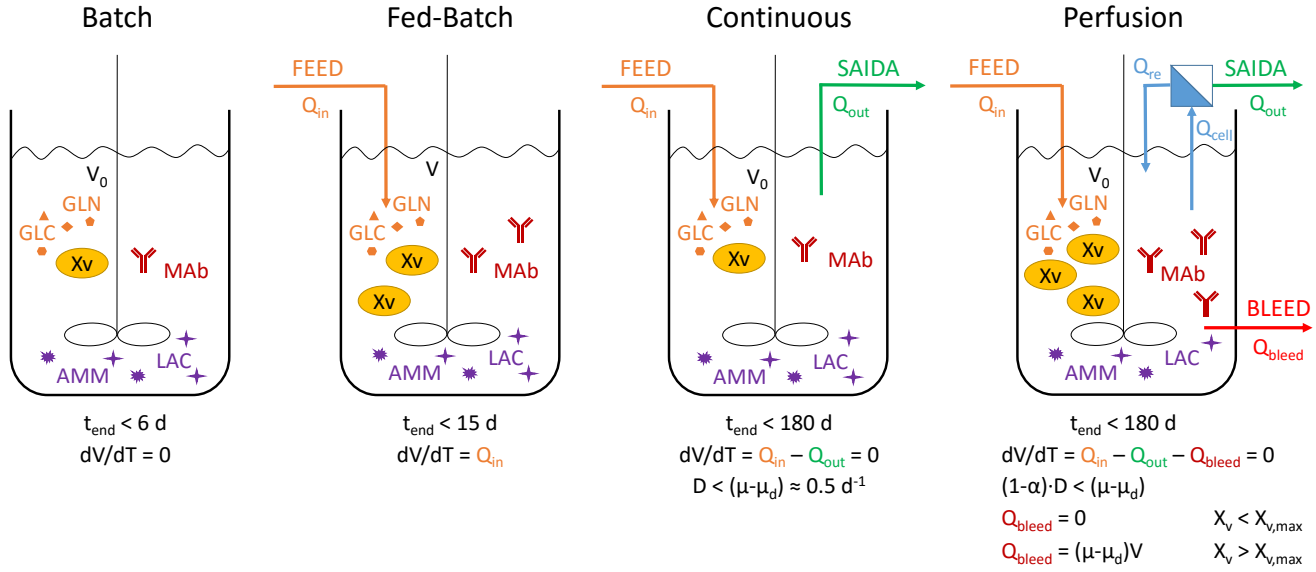


Figura 1. Modos de operação de biorreatores de tanque agitado: Primeiro, a batelada simples, em que o tanque tem concentrações iniciais de células e substrato. O tempo de operação t_{end} é limitado pelo consumo dos substratos GLC e GLN e pela acumulação dos co-produtos tóxicos LAC e AMM. Na batelada alimentada, novos substratos são adicionados durante o processo, que aumenta máximo tempo de operação do biorreator para 15 dias. No modo de operação contínuo, um vazão de saída é adicionado e o volume mantido constante. A taxa de diluição D do reator é limitado pela taxa de crescimento das células. Se for maior, mais células são retiradas do reator do que produzidas, um fenômeno chamado *washout*. Na operação em perfusão, um reciclo de células é adicionado na vazão de saída. Assim são permitidos taxas de diluição altas sem levar ao *washout* do biorreator, e concentrações altas de células são alcançadas. O tempo de operação ambos no contínuo e na perfusão é limitado pelo fato que as células podem sofrer alterações genéticas durante o processo, que podem afetar a qualidade do produto.

Figura 2. Validação do modelo da batelada simples.

meio de alimentação, GLC_{in} e GLN_{in} respectivamente.

$$\frac{d(VX_v)}{dt} = (\mu_X X_v - k_d X_v) V \quad (3a)$$

$$\frac{d(VX_d)}{dt} = (k_d X_v) V \quad (3b)$$

$$\frac{d(VGLC)}{dt} = \left(-\frac{\mu_X X_v}{Y_{X_v/GLC}} - \frac{a_1 \mu_X X_v}{Y_{LAC/GLC}} + Q_{in} GLC_{in} \right) V \quad (3c)$$

$$\frac{d(VGLN)}{dt} = \left(-K \cdot GLN - \frac{\mu_X X_v}{Y_{X_v/GLN}} - \frac{a_2 \mu_X X_v}{Y_{AMM/GLN}} + Q_{in} GLN_{in} \right) V \quad (3d)$$

$$\frac{d(VLAC)}{dt} = (a_3 \mu_X X_v + b_1 X_v) V \quad (3e)$$

$$\frac{d(VAMM)}{dt} = (a_4 \mu_X X_v) V \quad (3f)$$

$$\frac{d(VMAb)}{dt} = (a_5 \mu_X X_v + b_2 X_v) V \quad (3g)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} \quad (3h)$$

a equação 3h. As outras equações, todas concentrações em função ao volume, foram modificadas em respeito à mudança do volume. Nas equações de GLC e GLN foram adicionados termos que respondem à adição de nutrientes, a vazão de entrada multiplicando com a concentração de GLC e GLN no

Para não diluir o reator, o meio de alimentação costume ter concentrações elevadas das nutrientes. Aqui, foi escolhido um meio de alimentação cinco vezes mais concentrado que o meio

de cultivo inicial. A alimentação pode ser feita seguindo diferentes estratégias, adição de nutrientes em impulsos, passos, escoamento constante ou controlado em respeito ao metabolismo das células. Na batelada alimentada, não só o tempo da operação aumenta, mas concentrações de células e produto maiores são alcançados. Na figura 3 são mostrados os dados obtidos usando uma estratégia de alimentação comum, primeiro operar o biorreator sem alimentação, e quando os nutrientes chegam num nível baixo, ativar uma alimentação constante para fornecer novos nutrientes (aqui depois 48 h).

Figura 3. Operação em batelada alimentada.

Podemos observar um aumento no tempo de operação (148 h vs. 100 h na batelada simples) e na concentração de produto final.

1.3 Biorreator Contínuo

O biorreator contínuo foi modelado a partir do modelo 3 do biorreator em operação batelada alimentada. A equação diferencial para o volume foi acrescentado com o termo $-Q_{out}$, que representa o vazão de saída do reator:

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{out} \quad (4)$$

Os balanços de massa dos substratos, produtos e células com um termo do componente multiplicando $-Q_{out}$, que representa a taxa do componente retirado pelo vazão de saída. No seguinte, podemos acompanhar a transformação do modelo no exemplo do balanço de massa de células:

$$\frac{d(VX_V)}{dt} = (\mu_X X_V - k_d X_V) V - Q_{out} X_V \quad (5)$$

Agora, considerando que o volume é mantido constante durante o processo, ou seja, $Q_{in} = Q_{out}$, obtemos:

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{out} = 0 \quad (6)$$

Agora, dividindo a equação 5 pelo volume, e introduzindo a diluição D definido como vazão sobre volume $D = \frac{Q}{V}$ obtemos:

$$\frac{dX_V}{dt} = \mu_X X_V - k_d X_V - DX_V \quad (7)$$

Aplicando isso para todos balanços de massa obtemos o sistema:

$$\frac{dX_V}{dt} = \mu_X X_V - k_d X_V - DX_V \quad (8a)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_V - DX_d \quad (8b)$$

$$\frac{dGLC}{dt} = -\frac{\mu_X X_V}{Y_{XV/GLC}} - \frac{a_1 \mu_X X_V}{Y_{LAC/GLC}} + D(GLC_{in} - GLC) \quad (8c)$$

$$\begin{aligned} \frac{dGLN}{dt} = & -K \cdot GLN - \frac{\mu_X X_V}{Y_{XV/GLN}} \\ & - \frac{a_2 \mu_X X_V}{Y_{AMM/GLN}} + D(GLN_{in} - GLN) \end{aligned} \quad (8d)$$

$$\frac{dLAC}{dt} = a_3 \mu_X X_V + b_1 X_V - DLAC \quad (8e)$$

$$\frac{dAMM}{dt} = a_4 \mu_X X_V - DAMM \quad (8f)$$

$$\frac{dMAB}{dt} = a_5 \mu_X X_V + b_2 X_V - DMAB \quad (8g)$$

No modo de operação contínuo, a taxa de diluição é limitado pela taxa de crescimento das células. Se a taxa de diluição for maior que a taxa de proliferação ($\mu_X - k_d$), o balanço de massa para X_V vira negativa e a concentração cai, até possivelmente atingir um novo estado estacionário. Para uma diluição maior que a taxa específica de crescimento celular máxima $\mu_{X,max}$, a concentração de células cai para 0, um processo chamado *washout*. Porém, não é possível alcançar concentrações de células e produtividades elevadas, e o modo de operação contínuo é mais usado para estudar o metabolismo das linhagens de células.

Figura 4. Diferentes estados estacionários na operação contínua, com taxas de diluição D diferentes.

Na figura 4 podemos ver o modelo com diferentes taxas de diluição, levando ao diferentes estados estacionários. Primeiro, uma taxa de diluição de 0.0138 h^{-1} leva a uma concentração de células elevada. Depois 500 h a taxa de diluição é aumentado para 0.035 h^{-1} , e podemos observar um novo estado estacionário com concentrações de células e produtos menores e concentrações de substratos maiores. Com uma taxa de diluição 0.065 h^{-1} , um pouco maior que $\mu_{X,max}$ (0.063 h^{-1}), vemos o efeito de *washout*, as células são retiradas mais rápidos do que conseguem se proliferar, e logo a concentração cai para 0.

Figura 5. Continuação de equilíbrio do reator contínuo

Para analisar os estados estacionários do sistema, continuação de equilíbrio (Figura 5) foi feito com o pacote MatCont6p6 em MATLAB [?]. Pode se observar os estados estacionários da concentração de células viáveis X_V em função da diluição. Na diluição $D = \mu_{X,max}$, o estado do estacionário não há mais células (como esperado pelo *washout*), e encontrou-se um

ponto de bifurcação. A continuação do ponto de bifurcação revela que, sem células no reator, as concentrações dos produtos são iguais a 0 e a concentração de GLC é igual a concentração de alimentação GLC_{in} . Apenas concentração de GLN varia, que é explicado pela decomposição de primeira ordem da glutamina. Assim achou-se um erro no modelo, pois um dos produtos da decomposição de glutamina é a amônia, e isso não é representado pelas equações do modelo.

1.4 Perfusão

Cell retention device

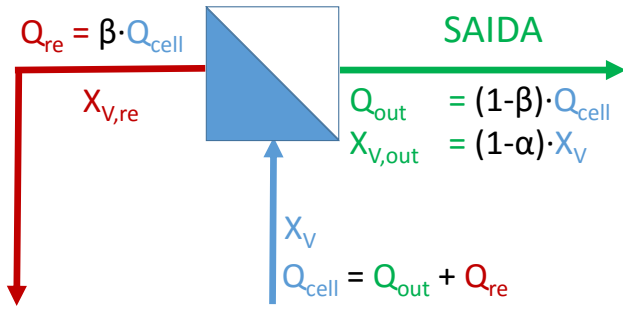


Figura 6. Equipamento de retenção de células

A modelagem do biorreator em perfusão foi feita a partir do modelo contínuo 8. Na perfusão a vazão de saída é equipado com um equipamento de retenção de células, que separa com uma eficiência α as células e realimenta-as com o vazão de reciclo Q_{re} no biorreator 6. Assim é superado o problema de *Wash-Out* que limita a diluição na operação contínua (Seção 1.3), e com taxas de diluição altas, concentrações de células elevadas são alcançadas. Portanto, a concentração de células é limitada pela oxigenação do reator, pois é preciso controlar-a com *cell bleeding*. Isso é a implementação de um vazão de *bleeding* Q_b , que retira volume do reator sem retenção de células. Então a equação para o volume fica:

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{out} - Q_b \quad (9)$$

A vazão Q_b é controlada para manter a concentração de células num nível constante. Controlando as vazões Q_{in} e Q_{out} , o volume pode ser mantido constante, então foi considerado novamente $\frac{dV}{dt} = 0$.

Para os balanços de massa no equipamento de retenção de células:

$$Q_{cell} = Q_{out} - Q_{re} \quad (10)$$

$$Q_{cell}X_V = Q_{out}X_{V,out} - Q_{re}X_{V,re} \quad (11)$$

Considerando a razão entre os vazões $\beta = \frac{Q_{re}}{Q_{cell}}$ no equipamento, com $0 < \beta < 1$ obtemos:

$$Q_{re} = \frac{\beta Q_{out}}{(1-\beta)} \quad (12)$$

$$Q_{cell} = \frac{Q_{out}}{(1-\beta)} \quad (13)$$

E sabendo que $X_{V,out} = (1-\alpha)X_V$, obtemos com

$$X_{V,re} = \frac{Q_{cell}X_V - Q_{out}(1-\alpha)X_V}{Q_{re}} \quad (14)$$

tudo para escrever os novos balanços de massa para as células:

$$\frac{dX_V}{dt} = (\mu_X - k_d)X_V - Q_{cell}X_V + Q_{re}X_{V,re} - Q_bX_V \quad (15)$$

As mesmas mudanças aplicam-se para o balanço das células não viáveis X_d , pois o equipamento de retenção de células não distinta entre células viáveis e não viáveis. Assumindo uma eficiência α de 1, que é alcançado por modernos hidrociclones [?], e pelo fato que $\frac{dV}{dt} = 0$, chegamos no sistema de balanços simplificado:

$$\frac{dX_V}{dt} = \mu_X X_V - k_d X_V - \frac{Q_b}{V} X_V \quad (16a)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_V - \frac{Q_b}{V} X_d \quad (16b)$$

$$\frac{dGLC}{dt} = -\frac{\mu_X X_V}{Y_{XV/GLC}} - \frac{a_1 \mu_X X_V}{Y_{LAC/GLC}} + D(GLC_{in} - GLC) \quad (16c)$$

$$\frac{dGLN}{dt} = -K \cdot GLN - \frac{\mu_X X_V}{Y_{XV/GLN}} - \frac{a_2 \mu_X X_V}{Y_{AMM/GLN}} + D(GLN_{in} - GLN) \quad (16d)$$

$$\frac{dLAC}{dt} = a_3 \mu_X X_V + b_1 X_V - DLAC \quad (16e)$$

$$\frac{dAMM}{dt} = a_4 \mu_X X_V - DAMM \quad (16f)$$

$$\frac{dMAB}{dt} = a_5 \mu_X X_V + b_2 X_V - DMAB \quad (16g)$$

sendo a diluição D a razão entre $\frac{Q_{in}}{V}$. Para limitar a concentração de células abaixo de um valor crítico para a oxigenação, $X_{V,max}$, a vazão de *bleeding* foi definido como:

$$Q_b = \begin{cases} 0 & \text{para } X_V < X_{V,max} \\ (\mu_X - k_d)V & \text{para } X_V > X_{V,max} \end{cases} \quad (17)$$

Assim, para valores de X_V maior que $X_{V,max}$, o balanço de massa das células $\frac{dX_V}{dt}$ é zerado, ou seja, o vazão Q_b tira células do reator na mesma taxa de proliferação. Isso leva para os resultados desejados na simulação, porém, pelo fato que não é possível medir $(\mu_X - k_d)$ precisamente, não é aplicável na prática. São usados sensores de capacitância para medir X_V *on line* ou o oxigênio dissolvido como referência para o controle do processo [?].

Figura 7. Biorreator em perfusão

A operação típica de um reator em perfusão é mostrado na figura 7. A concentração do meio de alimentação foi escolhido

duas vezes mais concentrado que o meio inicial da cultura, $GLC_{in} = 10 \text{ gL}^{-1}$ e $GLN_{in} = 2.4 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. Em $t = 48 \text{ h}$ uma diluição de 3 d^{-1} é ligado e mantido constante. Os efeitos são o aumento de GLC e GLN e a retirada de LAC , AMM e mAB do reator. Pelo equipamento de retenção de células, a concentração de células não é afeitada, não há *washout*. Assim, a concentração de células aumenta ilimitada até chegar perto da limitação de oxigênio, quando o *bleeding* é ativada que controla a concentração de células num estado estacionário forçado ($30 \times 10^6 \text{ cells/mL}$).

2. Otimização

A otimização dinâmica foi realizada usando o pacote *DYNOPT 4.3.0* em MATLAB R2015a, que usa os métodos de colocação ortogonal e elementos finitas para transformar as problemas de otimização originais em problemas de programação não-linear (NLP), que são resolvidos por solvers de NLP apropriados [?].

Nas seguintes seções, distintas estratégias da otimização são aplicados nos diferentes modos de operação.

2.1 Batelada simples

Uma estratégia importante na otimização do modo de operação da batelada simples é a otimização do meio de cultivo. Porém, esses estudos tem que ser feito primeiramente empírico, pois os parâmetros dos modelos são sensíveis a mudanças no meio de cultivo.

2.2 Batelada alimentada

A otimização dinâmica foi usada para encontrar a melhor estratégia de alimentação na batelada alimentada. Como função objetivo foi considerado a concentração de anticorpo monoclonal no final da batelada, a vazão de entrada foi usado como variável de controle. Assim, foi formulado o problema de otimização 18. As restrições incluem que a vazão de entrada não pode ser negativa, ou seja, só alimentação é permitida, e que o volume não pode ultrapassar 500 L, para evitar diluição do biorreator.

$$\begin{aligned} \max_{Q_{in}(t)} \quad & \Phi = MAb(t_f) \\ \text{sujeito a} \quad & Q_{in}(t) \geq 0 \frac{\text{L}}{\text{h}} \\ & V(t) \leq 500 \text{ L} \end{aligned} \quad (18)$$

Na figura 8 encontra-se os resultados da otimização com uma colocação da variável manipulada $Q_{in}(t)$ em 4 elementos finitos. O ótimo encontrado foi de $MAb(t_f) = 147.602 \text{ mgL}^{-1}$. Com duas colocações, o ótimo encontrado foi de $MAb(t_f) = 150.665 \text{ mgL}^{-1}$ (gráfico não mostrado).

Figura 8. Batelada alimentada otimizada

2.3 Biorreator Contínuo

Na operação contínua, foi primeiro determinada qual o estado estacionário com a maior produtividade volumétrica de anticorpos $Q_{MAb} = DM_{Ab}$. O problema de otimização foi formulado como:

$$\begin{aligned} \max_D \quad & \Phi = Q_{MAb} \\ \text{sujeito a} \quad & D \geq 0 \text{ h}^{-1} \end{aligned} \quad (19)$$

O ótimo encontrado é de $Q_{MAb} = 1.6838 \text{ mgL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para uma taxa de diluição $D = 0.0138 \text{ h}^{-1}$ e uma concentração de células $X_V = 3.06 \times 10^6 \text{ cells/mL}$. Porém, nesta taxa de diluição o estado estacionário é apenas atingido depois aproximadamente 400 h, como pode se verificar na figura 1.3. Para aproveitar uma outra possibilidade da otimização dinâmica, foi escolhido melhorar o tempo até chegar na concentração de células do estado estacionário. O problema de otimização foi formulado:

$$\begin{aligned} \min_{D(t)} \quad & \Phi = t_f \\ \text{sujeito a} \quad & X_V(t_f) = 3.06 \times 10^6 \text{ cells/mL} \\ & D \geq 0 \text{ h}^{-1} \end{aligned} \quad (20)$$

O tempo mínimo encontrado foi de $t_f = 84.8977 \text{ h}$ para uma colocação de D e de $t_f = 84.7459 \text{ h}$ para duas colocações em D (Figura 9). Esses tempos não representam o tempo necessário até chegar no estado estacionário, para isso precisaria ser implementado restrições dizendo que as derivadas de todas as variáveis são nulas em t_f .

Figura 9. Perfil de diluição com duas colocações em D

O tempo mínimo também foi determinado para uma taxa de diluição constante, com *fmincon* (algoritmo ponto-interior) em MATLAB, usando a opção *event* para terminar a integração ao chegar em $X_V = 3.06 \times 10^6 \text{ cells/mL}$. O ótimo encontrado foi de $t_f = 98.2853 \text{ h}$, para uma taxa de diluição de 0.0051 d^{-1} . Isto é, 16 % maior comparado com os resultados da otimização dinâmica.

2.4 Perfusão

A perfusão é o modo de operação mais complicado, e um desafio é o controle da concentração de células, como foi discutido na seção 1.4. Então foi escolhido como objetivo melhorar o controle por volta do estado estacionário. O processo foi identificado (linearização no estado estacionário de $30 \times 10^6 \text{ cells/mL}$) e um controlador preditivo (MPC) criado usando o MPCTOOL em MATLAB/SIMULINK. Como perturbações possíveis foram escolhidos mudanças no meio de alimentação. O processo todo foi incluso em SIMULINK é testado dando perturbações na entrada e dando um novo setpoint para X_V (Figura 10).

Figura 10. MPC atuando em intervalos de 10 min para levar X_V de 30 para um novo setpoint de 28×10^6 cells/mL

Tabela 2. Comparação - modos de operação

Operação	Produtividade
Batelada simples	$19.217 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Batelada alimentada	$25.928 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Batelada alimentada otimizada	$30.540 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Continua	$1.683 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$
Perfusão	$391.886 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

O resultado foi comparado com a trajetória do tempo mínimo por DYNOPT. O problema de otimização foi formulado como:

$$\begin{aligned}
 & \min_{Q(t)} \quad \Phi = t_f \\
 & \text{sujeito a} \quad \begin{aligned}
 & X_V(t_f) = 28 \times 10^6 \text{ cells/mL} \\
 & 0 \text{ Lh}^{-1} \leq Q_{in}(t) \leq 100 \text{ Lh}^{-1} \\
 & 0 \text{ Lh}^{-1} \leq Q_{out}(t) \leq 100 \text{ Lh}^{-1} \\
 & 0 \text{ Lh}^{-1} \leq Q_b(t) \leq 20 \text{ Lh}^{-1} \\
 & 390 \text{ L} \leq V(t) \leq 410 \text{ L}
 \end{aligned}
 \end{aligned} \tag{21}$$

As restrições são as mesmas que foram dados para o MPC. O mínimo encontrado é de $t_f = 1.4716 \text{ h}$, e os resultados são encontrados em figura 11. A resposta ambos da otimização e do MPC para levar a concentração de células para 28×10^6 cells/mL é de aumentar o vazão de *bleeding* Q_b para o máximo da restrição. O resultado da otimização dinâmica indica que o caminho mais rápido é de manter Q_{out} no mínimo de 0 Lh^{-1} , mas essa solução não garante estabilidade no final. Foi tentado implementar a otimização dinâmica como *dynamic real time optimization* (D-RTO) para dar uma trajetória de setpoints ótimos para o MPC operar, mas a implementação falhou por causa de incompletabilidades entre algumas funções do DynOpt e a compilação de Simulink.

Figura 11. Resultado da otimização dinâmica

perfusão ia permitir uma planta de produção muito menor para a mesma quantidade de produto. Porém, na indústria o processo de perfusão ainda não é muito estabelecido. Isto tem por causa a grande complexabilidade em comparação com os processos em batelada alimentada, que são os mais usados para produção de biofármacos.

Podemos concluir que as disciplinas de otimização e controle, ambos baseados em modelos robustos, oferecem grandes possibilidades para a indústria biofarmacêutica, que é hoje em dia principalmente baseado em estudos empíricos.

Agradecimentos

Agradeço ao Leonardo do Laboratório de Desenvolvimento de Software para Otimização e Controle de Processos (Lades, COPPE/UFRJ), pelo suporte no conceito e na implementação do MPC + D-RTO.

3. Resultados e Discussão

Nas secções anteriores, os diferentes modos de operação de biorreatores em tanque agitado foram apresentados, modelados, e otimizados. Na tabela 2 os resultados dos diferentes modos de operação são comparadas. Os cálculos para os processos em batelada foram feitos sem considerar o tempo entre cada batelada necessário para limpeza e esterilização do biorreator. Os dados destacam claramente a perfusão como modo de operação superior, com uma produtividade volumétrica mais que 10 vezes maior que da batelada alimentada otimizada. Pensando na escala do processo de produção, o processo em

Tabela 3. Tabela de parâmetros

Parâmetro	Descrição	Unidade	Valor
$\mu_{X,max}$	Taxa específica de crescimento celular máxima	h^{-1}	$6.30 \cdot 10^{-2}$
k_{GLN}	Constante de limitação da glutamina para crescimento	g/L	$2.65 \cdot 10^{-3}$
$k_{i,AMM}$	Constante de inibição do amônio para crescimento	g/L	$6.57 \cdot 10^{-2}$
$k_{i,LAC}$	Constante de inibição do lactato para crescimento	g/L	15.1
$k_{d,max}$	Taxa específica de morte celular máxima	h^{-1}	$7.63 \cdot 10^{-2}$
k_{AMM}^d	Constante de limitação do amônio para morte	g/L	$2.19 \cdot 10^{-2}$
k_{LAC}^d	Constante de limitação do lactato para morte	g/L	6.11
$k_{i,GLN}^d$	Constante de inibição da glutamina para morte	g/L	0.778
$Y_{X_v/GLC}$	Constante de rendimento glicose para células viáveis	$cells/g$	$1.16 \cdot 10^9$
$Y_{LAC/GLC}$	Constante de rendimento glicose para lactato	g/g	1.00
$Y_{X_v/GLN}$	Constante de rendimento glutamina para células viáveis	$cells/g$	$2.09 \cdot 10^{10}$
$Y_{AMM/GLN}$	Constante de rendimento glutamina para amônio	g/g	$2.10 \cdot 10^2$
K	Constante de primeira ordem para decomposição de glutamina	h^{-1}	$3.34 \cdot 10^{-3}$
a_1	Constante para consumo de glicose associada ao crescimento	$g/cell$	$5.20 \cdot 10^8$
a_2	Constante para consumo de glutamina associada ao crescimento	$g/cell$	$7.05 \cdot 10^{12}$
a_3	Constante para formação de lactato associada ao crescimento	$g/cell$	$1.15 \cdot 10^9$
a_4	Constante para formação de amônio associada ao crescimento	$g/cell$	$2.5 \cdot 10^{11}$
a_5	Constante para formação de MAb associada ao crescimento	$g/cell$	$8.67 \cdot 10^9$
b_1	Constante para formação de lactato não associada ao crescimento	$g/(cell \cdot h)$	$3.12 \cdot 10^{10}$
b_2	Constante para formação de MAb não associada ao crescimento	$g/(cell \cdot h)$	$3.89 \cdot 10^{10}$